



プラズマ照射が誘発する細胞膜輸送の作用機序に関する体系的研究

著者	佐々木 渉太
号	62
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	工博第5411号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00124478

氏名	ささき しょうた
授与学位	佐々木 渉太
学位授与年月日	博士 (工学)
学位授与の根拠法規	平成29年9月25日
研究科, 専攻の名称	学位規則第4条第1項
学位論文題目	東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 電子工学専攻
指導教員	プラズマ照射が誘発する細胞膜輸送の作用機序に関する体系的研究
論文審査委員	指 導 教 員 東北大学教授 金子 俊郎
	主査 東北大学教授 金子 俊郎 東北大学教授 安藤 晃
	東北大学教授 小玉 哲也 東北大学准教授 神崎 展
	東北大学准教授 加藤 俊顕

論文内容要旨

近年, 高い電子温度を持ちながら, 非常に低いガス温度 (40℃以下) を有する大気圧非平衡 (低温) プラズマの革新的な治療効果が報告され, 世界中で “プラズマ医療” 分野が急速に進展してきた. 一方で, プラズマの作用は非常に複合的 (衝撃波・電界・数 10 を超える活性種) であるが故に, 作用機序の解明は困難を極めており, 実用化に向けた大きな障害となっている. 数あるプラズマ医療応用の中に, 従来法と比べて効率・簡易性に優れた分子の細胞内導入技術がある. 2005 年から報告されているが, 現象の報告にとどまっているのが現状であり, 詳細な機構は不明な点が多かった.

これに対して著者は, 大気圧非平衡プラズマ生成装置を分子導入に適した形に改良することで, 高効率・高細胞生存率の両立および局所的な処理が可能であることを実証するとともに, 分子導入に寄与したプラズマの作用が複合的であることを示し, プラズマ生成活性種が細胞膜上の一過性受容体電位 (Transient Receptor Potential; TRP) チャネルを介在した細胞膜輸送を通して外来分子の細胞内取り込みを促進するという機序を明らかにした. 本論文は, これらの結果をまとめたものであり, 全 6 章から構成される.

第1章：序論

本章では, プラズマ医療分野について, その成り立ちや研究意義を含め, 詳細に述べている.

大気圧中でプラズマを生成する場合, 熱平衡状態, すなわち非常に高いガス温度となることが一般的であったが, ここ 20 年間で大気圧プラズマの生成法は急速に発展し, 理解され, 電子温度 ($> 1 \text{ eV}$) に比べて非常に低いガス温度 ($< 40^\circ\text{C}$) を有する大気圧非平衡プラズマが生成可能となった. この技術が可能とした, 生体に対する熱的損傷の無いプラズマ照射により, 革新的な治療効果 (癌の選択的アポトーシス誘導, 創傷治癒, 急速止血等) が得られることが報告されてから, 世界中で “プラズマ医療” 分野が急速に発展してきた. プラズマの作用は非常に複合的 (衝撃波・電界・数 10 を超える活性種) であるが故に, 作用機序の解明は困難を極めてい

方で、その複合刺激はこれまでにない細胞応答を惹起する可能性を秘めており、新たな治療技術の開発や新しい細胞の知覚機構発見につながる事が期待される。

数あるプラズマ医療応用の中に分子（遺伝子、タンパク質、抗がん剤）の細胞内導入がある。外来分子を細胞内に導入する技術は、iPS 細胞作製等をはじめとして生物学分野で欠かせない基礎技術であるとともに、高効率薬剤送達（ドラッグデリバリーシステム：DDS）の根幹技術である。従来開発されてきた電気穿孔法やリポソーム法においては、細胞膜損傷や異物の残存に由来する高い細胞損傷・毒性が問題となっていた。これに対して、2005 年から報告されているプラズマ照射による遺伝子導入は、高効率・簡易的に行える画期的な手法であったが、現象の報告にとどまっているのが現状であり、詳細な機構は不明な点が多かった。

このような背景の下、プラズマ由来の複合刺激を用いた新しい分子導入技術を開発することを着想し、大気圧プラズマ照射が誘発する細胞膜輸送の作用機序を包括的に調べることを本研究の目的としている。

第2章：実験方法及び原理

本章では、実験に用いた2種類の大気圧非平衡プラズマ生成装置、培養細胞、各種試薬、評価装置について述べている。また、実験の詳細な手順についても説明している。

大気圧プラズマは、マスフローコントローラーで流量制御されたヘリウム流に、タイマー制御された低周波高電圧（～10 kHz, ～10 kV）を印加することで生成した。プラズマ処理の方法は、対象物に直接プラズマを照射する“直接照射”とプラズマ照射した溶液を対象物に添加する“間接照射”の2通りを用いた。間接照射の際、プラズマ照射後の溶液を保持する温度及び時間を制御して実験を行った。

プラズマを評価するために、レーザー誘起蛍光法（LIF）、真空紫外（VUV）吸収分光法、シュリーレン法を使用した。また、プラズマ照射由来の電位上昇や活性種供給量を評価するために、ポッケルスセンサ、蛍光試薬、電子スピン共鳴法（ESR）、液体クロマトグラフィー（LC）、質量分析法（MS）を用いた。

本研究では、主に導入物質として、分子量 1270 程度の水溶性薬剤を模擬した分子である YOYO-1 を使用した。浮遊状態・接着状態の培養細胞に対して、YOYO-1 を添加しプラズマ処理した後、導入効率は蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーによる緑色蛍光観察によって評価した。また、生存率は赤色蛍光を利用する LIVE/DEAD Stain を使用して評価した。また、プラズマ間接照射後の細胞応答をリアルタイムで観測するために、生細胞イメージングを用いて、細胞内カルシウムイオン濃度（ $[Ca^{2+}]_i$ ）及び細胞内 YOYO-1 輸送量の時間推移をそれぞれ観測した。

第3章：大気圧プラズマを用いた高効率・低侵襲分子導入の実証

本章では、大気圧非平衡プラズマ生成装置を改良した過程と高効率・高細胞生存率の両立を実証した結果について述べている。

実験初期段階では、石英管の外側に巻かれた2つの円筒形電極間に低周波高電圧を印加することでプラズマを

生成し、70 mm 程度拡散させた後、細胞に直接照射する方法をとっていた。この後、拡散距離を 70 mm 程度から 35 mm 程度に短縮したところ、プラズマ照射に伴う生理食塩水の電位上昇（荷電粒子流入量の増加）とともに明確な YOYO-1 導入の効率上昇が観測された。この知見を基に、細胞が存在する溶液の直上をプラズマ生成領域とする（拡散距離を 0 にする）溶液電極型にプラズマ生成装置を改良した。この溶液電極型プラズマ生成装置では、高圧電極であるタングステンロッドと培養ディッシュの下に配置されたプレート型の接地電極で細胞を挟むような構造をとっている。この溶液電極型プラズマを、1 秒間照射することで、高効率（50%以上）・高細胞生存率（80%以上）の両立を実現した。さらに、溶液電極型プラズマでは、プラズマ照射部位のみで分子が導入されるため、局所的な処理が可能であることを示した。また、蛍光修飾 siRNA 及びプラスミド DNA といった遺伝子もプラズマ照射によって導入されることを明らかにした。

第4章：プラズマ分子導入の作用因子同定

本章では、水溶性薬剤を模擬した蛍光物質 YOYO-1 を用いて、分子導入促進因子を分離する実験について述べている。

大気圧でプラズマを生成し細胞へ照射した場合に、作用因子として有りうるものは、気相中のイオン、電子、紫外線、準安定励起原子・分子などが液面に降り注ぎ、液中で形成される電界・電流、対流（衝撃波）、活性種である。中でも活性種は、空気中の窒素・酸素・水の解離に由来して数 100 を優に超えると数値シミュレーションによって予測されている。これに対し、プラズマ直接照射と間接照射を使い分け、間接照射における添加までの時間“保持時間”を制御することで、作用因子の分離実験を行った。

プラズマ直接照射は、間接照射と比べ YOYO-1 導入効率が高く、尚且つ直接照射でのみ OH ラジカル・強電界を供給していた。また、プラズマ直接照射後の YOYO-1 導入された細胞の存在範囲と OH ラジカル供給範囲は、各実験条件下で概ね一致していたことから、OH ラジカルが直接照射の作用因子として示唆された。また、間接照射において、YOYO-1 導入効率の保持時間依存性を測定したところ、10 分程度まで導入効率が減少し（20% → 10%）、それ以降は 10% 程度で一定となった。一方で、プラズマ照射された生理食塩水に残存する活性種について、スピントラップ剤 CYPMPO を用いた ESR 法によって、各保持時間にて測定した。その結果、 O_2 ラジカル生成能が同程度の時間オーダーで減少していくことが観測され、 O_2 ラジカルが作用因子の 1 つとして示唆された。さらに、プラズマ照射後に長時間残存する活性種の効果は、同濃度の試薬から調製した H_2O_2 で再現できたため、 H_2O_2 の作用であることが示された。以上の結果より、プラズマ照射による高効率分子導入は微量の OH ラジカル O_2 ラジカル +（強電界）の複合的な要因によってもたらされたものであることを実験的に示した。

第5章：プラズマ照射 HEPES 緩衝生理食塩水が惹起する細胞膜輸送

本章では、プラズマ照射を行った HEPES 生理食塩水が惹起する細胞膜輸送を包括的に調べた結果について述

べている.

プラズマ照射後, 生理的環境下 (37°C, pH 7.4) の生理食塩水中において, 従来の化学的手法に比べ $1/10^5 \sim 1/10^4$ のコストで実現される特異な活性種反応系が形成されていることを, 吸収分光法, 蛍光プローブ法, ESR 法, LC-MS 法を組み合わせた多角的検討によって示しており, それに基づいた液中活性種反応モデルを提唱した.

また, そのプラズマ照射生理食塩水を添加した後に, 生細胞イメージングを行うことによって, $[Ca^{2+}]_i$ 応答は添加後 1 分以内に見られた一方で, YOYO-1 導入は 10 分後に開始する遅い膜輸送であることを明らかにした. さらに, $[Ca^{2+}]_i$ 上昇量・YOYO-1 導入量のどちらも, 保持時間が長くなるにつれて有意に減少し, どちらの応答も TRP チャネル阻害剤ルテニウムレッドによって, ほとんど完全に抑制された. 以上の結果から, プラズマ照射生理食塩水中の特異な活性種反応系が, 細胞膜上の TRP チャネルを介在した YOYO-1 取り込みを促進することを実験的に明らかにし, 上記の液中活性種反応モデルと合わせて包括的な作用機序モデルを提唱している.

第6章: まとめ

本章では結論を述べている.

以上まとめると本論文は, 高効率・高細胞生存率を両立した分子導入システムを可能とする大気圧非平衡プラズマ生成装置を開発し, プラズマ照射が誘発する分子導入の作用機序を体系的に調べた結果, 導入効率向上は複数の活性種の重畳効果によってもたらされたこと, および細胞が本来備える生理的機能を活用した分子取り込みがプラズマ照射生理食塩水中の特異な活性種反応系によって活性化されていることを明らかにしたものである.

論文審査結果の要旨

近年、高い電子温度を持ちながら、非常に低いガス温度（40°C 以下）を有する大気圧非平衡（低温）プラズマの革新的な治療効果が報告され、世界中で“プラズマ医療”分野が急速に進展している。数あるプラズマ医療応用の中で、外来分子を細胞内に導入する分子導入技術は、従来法で克服困難であった課題を解決する手法として期待されている。しかしながら、プラズマの作用は非常に複合的（衝撃波・電界・数十を超える活性種）であるがゆえに、作用機序の解明は困難を極めており、実用化に向けた大きな障害となっている。著者は、大気圧非平衡プラズマ生成装置を分子導入に適した形に改良することで、高効率・高細胞生存率の両立および局所的な処理が可能であることを実証するとともに、分子導入に寄与したプラズマの作用が複合的であることを示し、プラズマ生成活性種が細胞膜上の一過性受容体電位（Transient Receptor Potential; TRP）チャネルを介在した細胞膜輸送を通して外来分子の細胞内取り込みを促進するという機序を明らかにした。本論文は、これらの結果をまとめたものであり、全 6 章から構成される。

第 1 章は序論であり、研究背景、目的、及び研究の意義に関して述べている。

第 2 章では、本研究で使用した実験装置、細胞、試薬及び実験原理について述べている。また、実験の詳細な手順に関しても言及している。

第 3 章では、大気圧非平衡プラズマ生成装置を改良した過程と高効率・高細胞生存率の両立を実証した結果について述べている。実験初期段階では、細胞から 70 mm 程度離れた上部で生成し、拡散させたプラズマを用いていたが、拡散距離の減少に伴う導入効率上昇を見出し、細胞が存在する溶液の直上をプラズマ生成領域とする溶液電極型に改良することで、高効率（50%以上）・高細胞生存率（80%以上）の両立を実現した。さらに、溶液電極型プラズマでは、プラズマ照射部位のみで分子が導入されるため、局所的な処理が可能であることを示した。また、siRNA 及びプラスミド DNA といった遺伝子もプラズマ照射によって導入されることを明らかにした。

第 4 章では、水溶性薬剤を模擬した蛍光物質 YOYO-1 を用いて、分子導入促進因子を分離する実験について述べている。細胞に対してプラズマを直接照射した場合、電界や様々な液相中活性種が同時に作用している複雑系であることを実験的に明らかにしており、OH ラジカル(+電界)、O₂-ラジカル、H₂O₂ を導入促進因子の候補として挙げている。

第 5 章では、プラズマ照射を行った HEPES 生理食塩水が惹起する細胞膜輸送を統括的に調べた結果について述べている。プラズマ照射により、従来の化学的手法に比べ 1/10⁵~1/10⁴ のコストで実現される、生理的環境下（37°C, pH 7.4）における特異な活性種反応系が、細胞膜上の TRP チャネルを介在した YOYO-1 取り込みを促進することを実験的に明らかにし、詳細な計測に基づいて作用機序モデルを提唱している。

第 6 章は結論である。

以上要するに本論文は、高効率・高細胞生存率を両立した分子導入システムを可能とする大気圧非平衡プラズマ生成装置を開発し、プラズマ照射が誘発する分子導入の作用機序を体系的に調べた結果、導入効率向上は複数の活性種の重畳効果によってもたらされたこと、および細胞が本来備える生理的機能を活用した分子取り込みがプラズマ生成活性種によって活性化されていることを明らかにしたものであり、電子工学、プラズマ理工学、プラズマ医療科学、および分子生物学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。